

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

P24867.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Kensuke KOMATSU et al.

Serial No. : Not Yet Assigned

Filed : Concurrently Herewith

For : FLUORESCENT PROBE FOR ZINC


CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 2003-089987, filed March 28, 2003. As required by 37 C.F.R. 1.55, a certified copy of the Japanese application is being submitted herewith.

Respectfully submitted,
Kensuke KOMATSU et al.

 Reg 16
Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027 33,329

January 30, 2004
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 8 日
Date of Application:

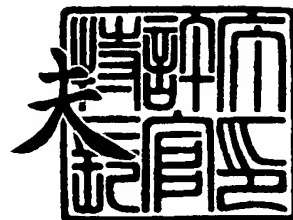
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 9 9 8 7
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 8 9 9 8 7]

出 願 人 長野 哲雄
Applicant(s): 第一化学薬品株式会社

2 0 0 4 年 1 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 1 0 8 2 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 A31184M

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成15年 3月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区東品川 3 - 1 5 - 1 4 - 7 0 4

 【氏名】 小松 兼介

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区本郷 1 - 2 1 - 7 朝日後楽園マンション
9 0 2

 【氏名】 平野 智也

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市栄区小菅ケ谷 1 丁目 5 番 南小菅ケ谷住
宅 1 - 3 1 5

 【氏名】 菊地 和也

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都杉並区天沼 1 - 2 8 - 1 5

 【氏名】 長野 哲雄

【特許出願人】

 【識別番号】 595108044

 【氏名又は名称】 長野 哲雄

【特許出願人】

 【識別番号】 390037327

 【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205822

【包括委任状番号】 0205823

【プルーフの要否】 要

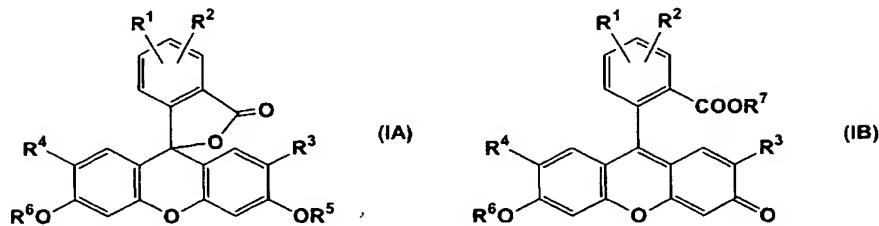
【書類名】 明細書

【発明の名称】 亜鉛蛍光プローブ

【特許請求の範囲】

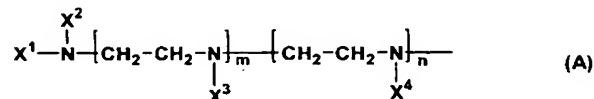
【請求項 1】 下記の一般式 (IA) 又は (IB) :

【化 1】



〔式中、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子又は下記の式(A) :

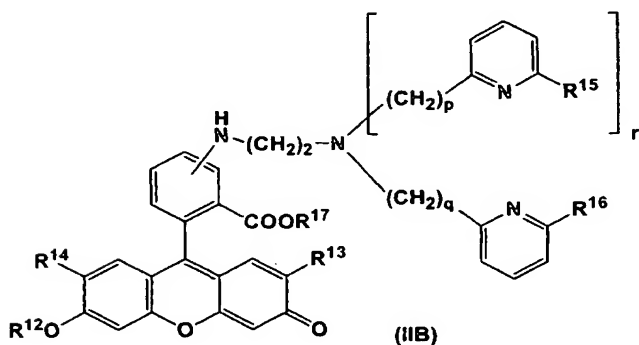
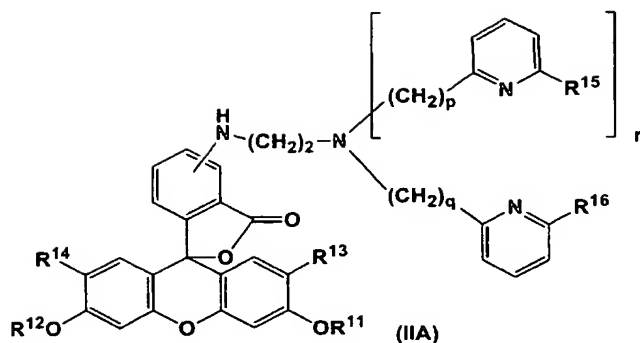
【化 2】



(式中、X¹、X²、X³、及びX⁴はそれぞれ独立に水素原子、2-ピリジルメチル基、2-ピリジリエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、又は2-メチル-6-ピリジリエチル基を示すが、X¹、X²、X³、及びX⁴からなる群から選ばれる基のうち少なくとも1つは2-ピリジリエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、及び2-メチル-6-ピリジリエチル基からなる群から選ばれる基を示し；m及びnはそれぞれ独立に0又は1を示すが、m及びnが同時に0となることはない) で表される基を示すが、R¹及びR²が同時に水素原子であることはなく；R³及びR⁴はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し；R⁵及びR⁶はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し、R⁷は水素原子又はアルキル基を示す〕で表される化合物又はその塩。

【請求項 2】 下記の一般式 (IIA) 又は (IIB) :

【化 3】



(式中、 R^{11} 及び R^{12} はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し； R^{13} 及び R^{14} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^{15} 及び R^{16} はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を示し； R^{17} は水素原子又はアルキル基を示し； p 及び q はそれぞれ独立に 1 又は 2 を示し、 r は 0 又は 1 を示すが、

r が 1 である場合には、 R^{15} 及び R^{16} が同時に水素原子であり、かつ p 及び q が同時に 1 であることはなく、

r が 0 である場合には q は 2 である) で表される化合物又はその塩。

【請求項 3】 R^{13} 及び R^{14} が水素原子である請求項 2 に記載の化合物又はその塩

。

【請求項 4】 R^{17} が水素原子である請求項 2 又は 3 に記載の化合物又はその塩

。

【請求項 5】 請求項 1 に記載の一般式 (IA) 又は (IB) で表される化合物又はその塩を含む亜鉛蛍光プローブ。

【請求項 6】 請求項 1 に記載の一般式 (IA) 若しくは (IB) 又はその塩と亜鉛イオ

ンとから形成される亜鉛錯体。

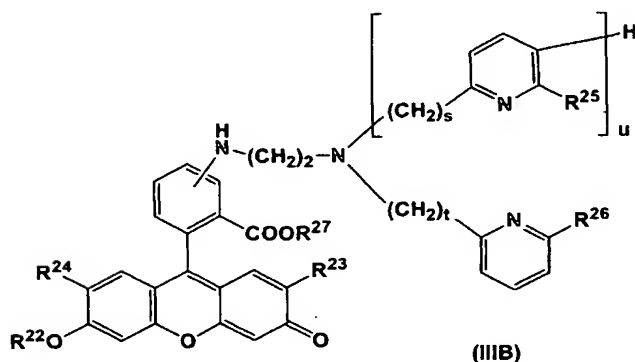
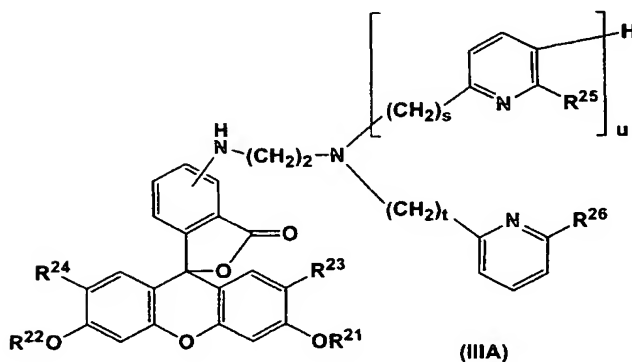
【請求項 7】 亜鉛イオンの測定方法であって、下記の工程：

(a) 請求項 1 に記載の一般式 (IA) 若しくは (IB) で表される化合物又はその塩と亜鉛イオンとを反応させる工程、及び

(b) 上記工程 (a) で生成した亜鉛錯体の蛍光強度を測定する工程を含む方法。

【請求項 8】 亜鉛イオンの測定方法であって、下記の一般式 (IIIA) 又は (IIIB)：

【化 4】



(式中、 R^{21} 及び R^{22} はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し； R^{23} 及び R^{24} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^{25} 及び R^{26} はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を示し； R^{27} は水素原子又はアルキル基を示し； s 及び t はそれぞれ独立に 1 又は 2 を示し、 u は 0 又は 1 を示す) において、下記の (1) から (14)：

(1) s 及び t が 1 であり、 u が 1 であり、 R^{25} 及び R^{26} が水素原子である化合物又はそ

の塩

(2) s及びtが1であり、uが1であり、R²⁵が水素原子であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(3) s及びtが1であり、uが1であり、R²⁵及びR²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(4) sが1であり、tが2であり、uが1であり、R²⁵及びR²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(5) sが1であり、tが2であり、uが1であり、R²⁵が水素原子であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(6) sが1であり、tが2であり、uが1であり、R²⁵がメチル基であり、R²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(7) sが1であり、tが2であり、uが1であり、R²⁵及びR²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(8) s及びtが2であり、uが1であり、R²⁵及びR²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(9) s及びtが2であり、uが1であり、R²⁵が水素原子であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(10) s及びtが2であり、uが1であり、R²⁵及びR²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(11) tが1であり、uが0であり、R²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(12) tが1であり、uが0であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(13) tが2であり、uが0であり、R²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(14) tが2であり、uが0であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

からなる群から選択される2個以上の化合物又はその塩を用いて亜鉛イオンを測定する工程を含む方法。

【請求項9】 R²³、R²⁴、及びR²⁷が水素原子である請求項8に記載の方法。

【請求項10】 請求項8に記載の(1)から(14)の化合物又はその塩からなる群から選ばれる2個以上の化合物又はその塩を含む亜鉛イオン測定用のキット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、亜鉛イオンを特異的に捕捉して蛍光を発する亜鉛蛍光プローブに関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

亜鉛はヒトの体内において鉄に次いで含量の多い必須金属元素であり、細胞内のほとんどの亜鉛イオンは蛋白質と強固に結合して、蛋白質の構造保持や機能発現に関与している。また、細胞内にごく微量存在するフリーの亜鉛イオン（通常は μ M レベル以下である）の生理的役割についても、種々の報告がある。特に、細胞死の一つであるアポトーシスには亜鉛イオンが深く関わっていると考えられており、アルツハイマー病の老人斑の形成を促進しているなどの報告もある。

【 0 0 0 3 】

従来、組織内の亜鉛イオンを測定するために、亜鉛イオンを特異的に捕捉して錯体を形成し、錯体形成に伴って蛍光を発する化合物（亜鉛蛍光プローブ）が用いられている。亜鉛蛍光プローブとして、例えば、T S Q (Reyes, J.G., et al., Biol. Res., 27, 49, 1994)、Zinquin ethyl ester (Tsuda, M. et al., Neurosci., 17, 6678, 1997)、Dansylaminoethylcyclen (Koike, T. et al., J. Am. Chem. Soc., 118, 12686, 1996)、Newport Green (Molecular Probe社のカタログである"Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" 6th Edition by Richard P. Haugland pp.531-540)などが実用化されている。

【 0 0 0 4 】

しかしながら、T S Q、Zinquin、又はDansylaminoethylcyclenを用いた測定では、短波長領域の励起光を用いる必要があるために（それぞれ、励起波長が367nm、368nm、及び323nmである。）、これらの亜鉛蛍光プローブを生体系の測定に用いた場合には、短波長による励起が細胞傷害を引き起こす可能性があり（細胞工学, 17, pp.584-595, 1998）、また、測定の際に細胞系自身が有する自家蛍光（NADHやフラビン類が発する蛍光）による影響を受けやすいという問題がある。さらに、Dansylaminoethylcyclenは測定時に試薬が存在する環境の違い、すなわ

ち溶媒の種類、あるいは細胞外、細胞内もしくは細胞膜などにおける水溶性、脂溶性などの環境の違いにより蛍光強度が大きく変化するという欠点を有しており（蛋白質・核酸・酵素、増刊号，42，pp.171-176，1997）、TSQは脂溶性が高いために細胞全体に均一に分布させることが困難であるという問題も有している。Newport Greenは長波長の励起光で測定を行なえるものの、亜鉛イオンとのアフィニティーが低く、実用的な測定感度を有していないという問題がある。従って、細胞障害を引き起こすことなく、高感度に亜鉛イオンを測定できる亜鉛蛍光プローブの開発が求められていた。

【0005】

本発明者らは高感度な亜鉛蛍光プローブを提供すべく鋭意研究を行った結果、環状アミン又はポリアミンを置換基として有する化合物が亜鉛イオンに対して高い特異性を有しており、亜鉛イオンを捕捉して、長波長領域の励起光で強い蛍光を発する錯体を形成することを見出した（特願平11-40325号）。また、本発明者らはさらに研究を重ね、生体内の亜鉛を極めて正確かつ高感度に測定できるフルオレセイン誘導体を提供することに成功した（国際公開W0 01/62755）。もっとも、このフルオレセイン誘導体は極めて亜鉛イオンに対する親和性が高いことから、低濃度の亜鉛イオンの検出には優れるものの、高濃度の亜鉛イオンを正確に測定することに困難があった。このため、より広い範囲で正確に亜鉛イオン濃度を測定できる手段の提供が求められている。

【特許文献1】 国際公開W0 01/62755

【0006】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

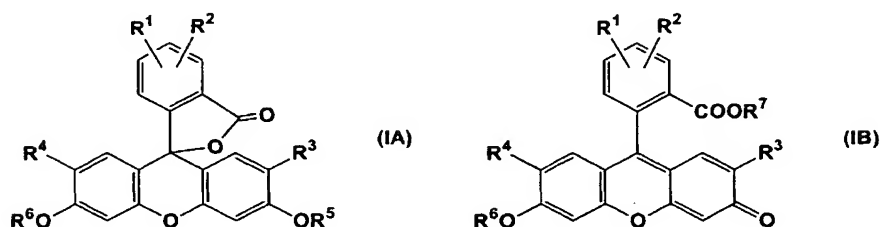
本発明の課題は、低濃度から高濃度までの広い範囲で亜鉛イオンを正確に測定するための手段を提供することにある。本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、国際公開W0 01/62755に記載されたフルオレセイン誘導体に修飾を加えることによって高濃度の亜鉛イオンを正確に測定できること、及びそのようにして提供された新規フルオレセイン誘導体と国際公開W0 01/62755に記載されたフルオレセイン誘導体とを組み合わせることにより、極めて広範囲な濃度にわたって亜鉛イオン濃度を正確に測定できることを見出した。本発明は上記

の知見を基にして完成されたものである。

【0007】

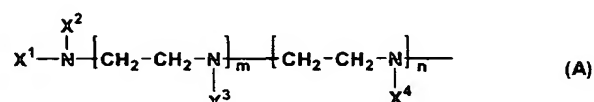
すなわち、本発明により、下記の一般式(IA)又は(IB)：

【化5】



〔式中、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子又は下記の式(A)：

【化6】

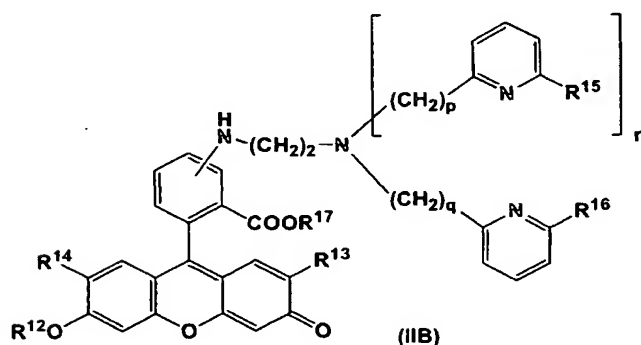
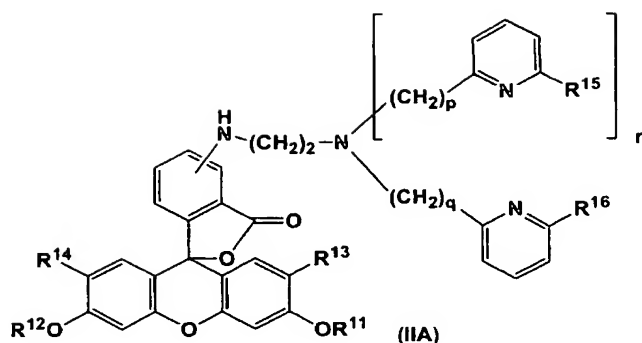


(式中、X¹、X²、X³、及びX⁴はそれぞれ独立に水素原子、2-ピリジルメチル基、2-ピリジルエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、又は2-メチル-6-ピリジルエチル基を示すが、X¹、X²、X³、及びX⁴からなる群から選ばれる基のうち少なくとも1つは2-ピリジルエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、及び2-メチル-6-ピリジルエチル基からなる群から選ばれる基を示し；m及びnはそれぞれ独立に0又は1を示すが、m及びnが同時に0となることはない) で表される基を示すが、R¹及びR²が同時に水素原子であることはなく；R³及びR⁴はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し；R⁵及びR⁶はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し、R⁷は水素原子又はアルキル基を示す〕で表される化合物又はその塩が提供される。

【0008】

上記の発明の好ましい態様として、下記の一般式(IIA)又は(IIB)：

【化7】



(式中、 R^{11} 及び R^{12} はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し； R^{13} 及び R^{14} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^{15} 及び R^{16} はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を示し； R^{17} は水素原子又はアルキル基を示し； p 及び q はそれぞれ独立に1又は2を示し、 r は0又は1を示すが、

r が1である場合には、 R^{15} 及び R^{16} が同時に水素原子であり、かつ p 及び q が同時に1であることはなく、

r が0である場合には q は2である) で表される化合物又はその塩が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、及び R^{14} が水素原子である上記化合物又はその塩；及び R^{17} が水素原子である上記化合物又はその塩が提供され、さらに好ましい態様によれば、ベンゼン環上の置換アミノ基が $-COOR^{17}$ で表される基に対してメタ位又はパラ位に結合する化合物又はその塩が提供される。

【0009】

別の観点からは、本発明により、上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、若しくは(IIB)で表される化合物又はそれらの塩を含む亜鉛蛍光プローブ；及び上記一般式(IA)

、(IB)、(IIA)、若しくは(IIB)で表される化合物又はそれらの塩と亜鉛イオンとから形成される亜鉛錯体が提供される。この亜鉛蛍光プローブは、組織や細胞内の亜鉛イオンを測定するために用いることができる。

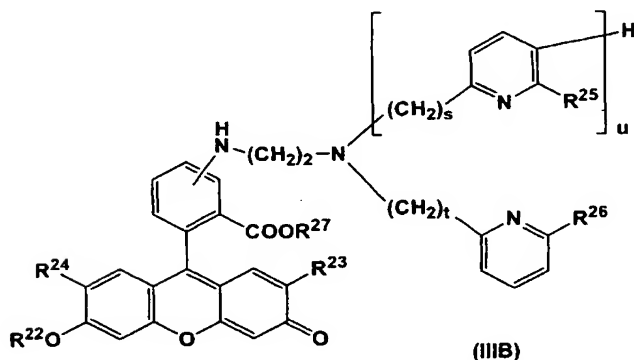
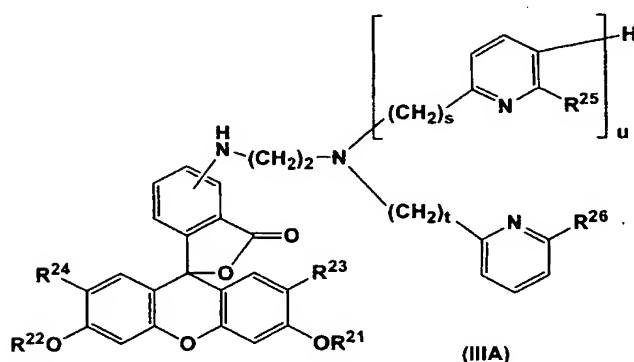
【0010】

また、本発明により、亜鉛イオンの測定方法であって、上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、若しくは(IIB)で表される化合物又はそれらの塩を亜鉛蛍光プローブとして用いる方法；亜鉛イオンの測定方法であって、下記の工程：(a)上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、若しくは(IIB)で表される化合物又はその塩と亜鉛イオンとを反応させる工程、及び(b)上記工程で生成した亜鉛錯体の蛍光強度を測定する工程を含む方法；並びに、上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、若しくは(IIB)で表される化合物又はそれらの塩の亜鉛蛍光プローブとしての使用が提供される。

【0011】

さらに別の観点からは、下記の一般式(IIIA)又は(IIIB)：

【化8】



(式中、 R^{21} 及び R^{22} はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はア

ルキルカルボニルオキシメチル基を示し； R^{23} 及び R^{24} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^{25} 及び R^{26} はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を示し； R^{27} は水素原子又はアルキル基を示し； s 及び t はそれぞれ独立に 1 又は 2 を示し、 u は 0 又は 1 を示す) において、下記の(1)から(14)：

(1) s 及び t が 1 であり、 u が 1 であり、 R^{25} 及び R^{26} が水素原子である化合物又はその塩

(2) s 及び t が 1 であり、 u が 1 であり、 R^{25} が水素原子であり、 R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

(3) s 及び t が 1 であり、 u が 1 であり、 R^{25} 及び R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

(4) s が 1 であり、 t が 2 であり、 u が 1 であり、 R^{25} 及び R^{26} が水素原子である化合物又はその塩

(5) s が 1 であり、 t が 2 であり、 u が 1 であり、 R^{25} が水素原子であり、 R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

(6) s が 1 であり、 t が 2 であり、 u が 1 であり、 R^{25} がメチル基であり、 R^{26} が水素原子である化合物又はその塩

(7) s が 1 であり、 t が 2 であり、 u が 1 であり、 R^{25} 及び R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

(8) s 及び t が 2 であり、 u が 1 であり、 R^{25} 及び R^{26} が水素原子である化合物又はその塩

(9) s 及び t が 2 であり、 u が 1 であり、 R^{25} が水素原子であり、 R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

(10) s 及び t が 2 であり、 u が 1 であり、 R^{25} 及び R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

(11) t が 1 であり、 u が 0 であり、 R^{26} が水素原子である化合物又はその塩

(12) t が 1 であり、 u が 0 であり、 R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

(13) t が 2 であり、 u が 0 であり、 R^{26} が水素原子である化合物又はその塩

(14) t が 2 であり、 u が 0 であり、 R^{26} がメチル基である化合物又はその塩

からなる群から選択される 2 個以上の化合物又はその塩を用いて亜鉛イオンを測

定する工程を含む方法が提供される。

【0012】

この発明の好ましい態様によれば、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、及び R^{27} が水素原子である上記の方法が提供される。この方法によれば、選択される2個以上の化合物又はその塩は、それぞれ異なる亜鉛イオン濃度領域において亜鉛錯体を形成することができ、広範囲の濃度で亜鉛イオンを測定することができる。さらに本発明により、上記の(1)から(14)の化合物又はその塩からなる群から選ばれる2個以上の化合物又はその塩を含む亜鉛イオン測定用のキットが提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】

本明細書において、「アルキル基」又はアルキル部分を含む置換基（例えばアルキルカルボニル基又はアルキルカルボニルオキシメチル基など）のアルキル部分は、例えば、炭素数1～12個、好ましくは炭素数1～6個、好ましくは炭素数1～4個の直鎖、分枝鎖、環状、又はそれらの組み合わせからなるアルキル基を意味している。より具体的には、アルキル基として低級アルキル基（炭素数1～6個のアルキル基）が好ましい。低級アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、シクロプロピルメチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基などを挙げることができる。本明細書においてハロゲン原子という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよく、好ましくはフッ素原子、塩素原子、又は臭素原子である。

【0014】

上記一般式(IA)及び(IB)において、ベンゼン環上に置換する R^1 及び R^2 の位置は特に限定されない。 R^2 が水素原子である場合には、 R^1 が $-COOR^7$ で表される基（ラクトン環を形成する場合には対応するカルボニル基）に対してメタ位又はパラ位に結合することが好ましい。一般式(IIA)及び(IIB)におけるベンゼン環上の置換アミノ基の位置は特に限定されないが、好ましくは、 $-COOR^{17}$ で表される基に対してメタ位又はパラ位であり、特に好ましくは $-COOR^{17}$ で表される基に対してパラ

位である。

【0015】

上記一般式(IA)及び(IB)で表される化合物において、 R^1 及び R^2 のいずれか一方が水素原子であり、他方が式(A)で表される基であることが好ましい。式(A)で表される基において、 X^1 、 X^2 、 X^3 、及び X^4 はそれぞれ独立に水素原子、2-ピリジルメチル基、2-ピリジルエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、又は2-メチル-6-ピリジルエチル基を示すが、 X^1 、 X^2 、 X^3 、及び X^4 からなる群から選ばれる基のうち少なくとも1つは2-ピリジルエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、及び2-メチル-6-ピリジルエチル基からなる群から選ばれる基を示す。上記一般式(IA)及び(IB)で表される化合物において、 m が0であり、 n が1であり、かつ X^4 が水素原子であることが好ましく、この場合に X^1 及び X^2 のうちの少なくとも1つが2-ピリジルエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、及び2-メチル-6-ピリジルエチル基からなる群から選ばれる基であることが好ましい。また、 m が0であり、 n が1であり、かつ X^4 が水素原子である場合において、 X^1 が2-ピリジルエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、及び2-メチル-6-ピリジルエチル基からなる群から選ばれる基であり、 X^2 が2-ピリジルメチル基、2-ピリジルエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、及び2-メチル-6-ピリジルエチル基からなる群から選ばれる基であることが好ましい。

【0016】

R^5 及び R^6 としては水素原子が好ましく、イメージングの用途では R^5 及び R^6 がアセチル基又はアセトキシメチル基であることが好ましい。 R^3 及び R^4 がともに水素原子であるか、ともに塩素原子であることが好ましい。 R^7 は水素原子であることが好ましい。

【0017】

上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物において、 R^{11} 及び R^{12} としては水素原子が好ましく、イメージングの用途では R^{11} 及び R^{12} がアセチル基又はアセトキシメチル基であることが好ましい。 R^{13} 及び R^{14} がともに水素原子であるか、ともに塩素原子であることが好ましく、 R^{13} 及び R^{14} がともに水素原子であることがさらに好ましい。 R^{17} が水素原子であることが好ましい。一般式(IIA)又は(IIB)で

表される化合物において、 p 及び q が1であり、 R^{15} が水素原子であり、 R^{16} がメチル基である化合物； p 及び q が1であり、 R^{15} 及び R^{16} がメチル基である化合物； p が1であり、 q が2であり、 R^{15} 及び R^{16} が水素原子である化合物； p が1であり、 q が2であり、 R^{15} が水素原子であり、 R^{16} がメチル基である化合物； p が1であり、 q が2であり、 R^{15} がメチル基であり、 R^{16} が水素原子である化合物； p 及び q が2であり、 R^{15} 及び R^{16} がメチル基である化合物； p 及び q が2であり、 R^{15} が水素原子であり、 R^{16} がメチル基である化合物；及び p 及び q が2であり、 R^{15} 及び R^{16} がメチル基である化合物が好ましい。

【0018】

上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、又は(IIB)で表される本発明の化合物は酸付加塩又は塩基付加塩として存在することができる。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、又はメタンスルホン酸塩、 p -トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができる。塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。本発明の化合物又はその塩は水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。

【0019】

上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、又は(IIB)で表される本発明の化合物は、置換基の種類により、1個又は2個以上の不斉炭素有する場合があるが、1個又は2個以上の不斉炭素に基づく光学活性体や2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体などの立体異性体のほか、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などは、いずれも本発明の範囲に包含される。また、 R^7 、 R^{17} 、又は R^{27} が水素原子の場合にはカルボキシル基がラク톤を形成する場合もあるが、本発明の範囲にはこのような構造異性体も包含される。なお、一般式(IA)において R^5 が水素原子である化合物と一般式(IB)において R^7 が水素原子である化合物は互変異性体に相当しており、一般式(IIA)において R^{11} が水素原子である化合物と一般式(IIB)におい

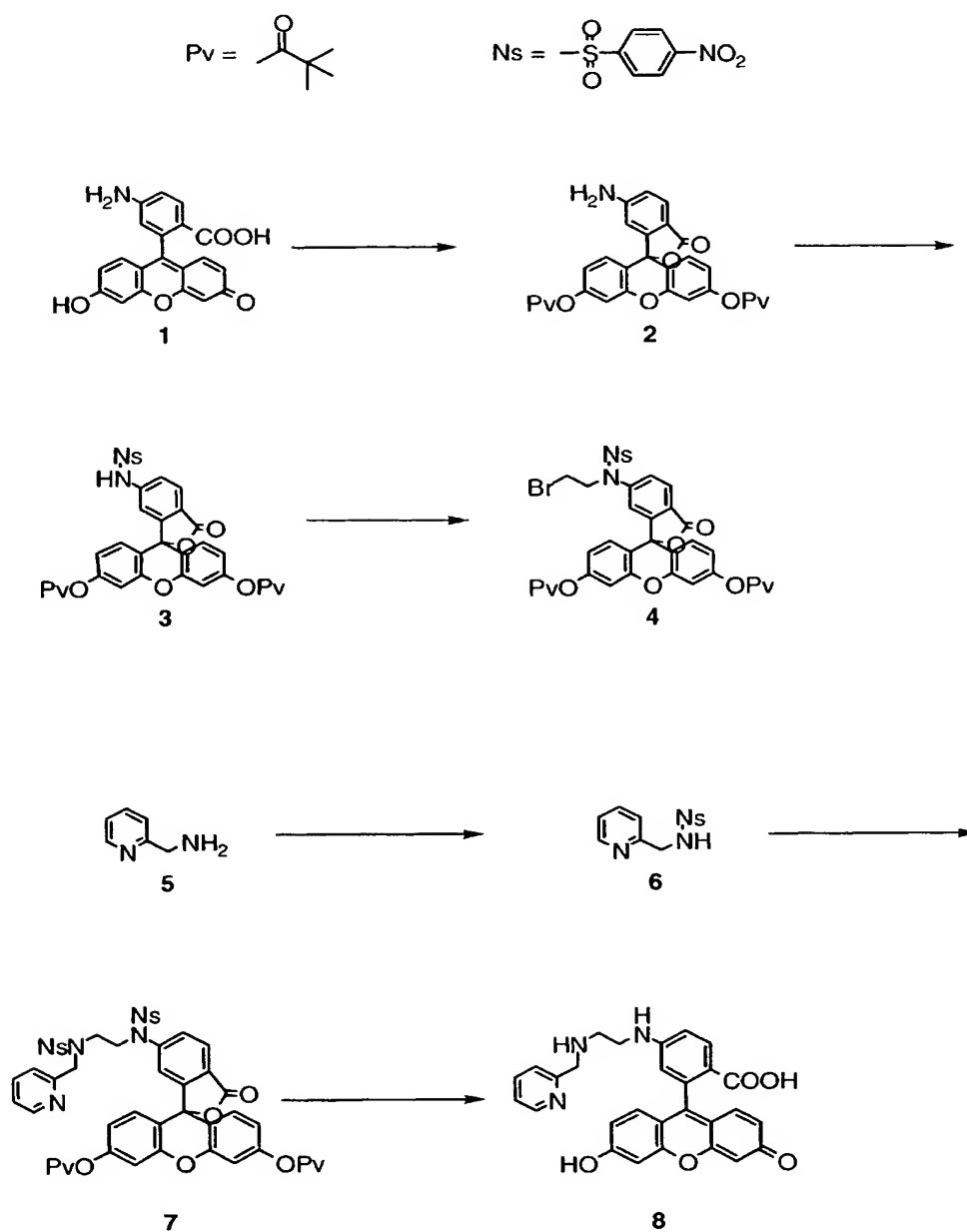
てR¹⁷が水素原子である化合物とは互変異性体に相当する。このような互変異性体の存在は当業者に容易に理解され、本発明の範囲にはいずれの互変異性体も包含されることを理解すべきである。

【0020】

本発明の化合物の代表的化合物の製造方法を下記のスキームに示す。また、本明細書の実施例には、このスキームに記載した製造方法がより詳細かつ具体的に示されている。従って、当業者は、これらの説明を基にして反応原料、反応条件、及び反応試薬などを適宜選択し、必要に応じてこれらの方法に修飾や改変を加えることによって、上記一般式で表される本発明の化合物をいずれも製造することができる。国際公開W0 01/62755には亜鉛イオン測定用のフルオレセイン誘導体の製造方法が開示されており、この刊行物を参照することにより、本発明の化合物を容易に製造できる場合もある。国際公開W0 01/62755の開示のすべてを参照として本明細書の開示に含める。

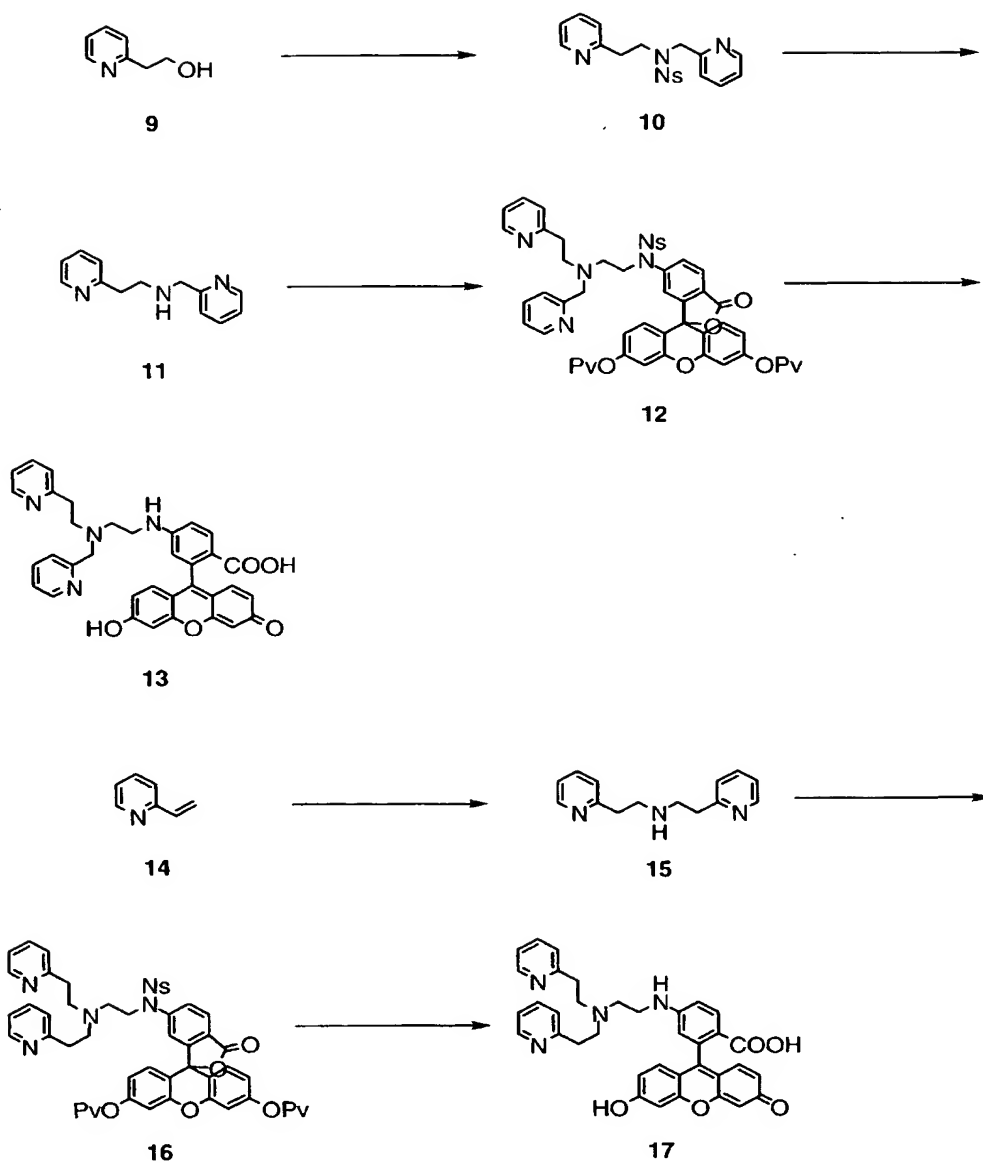
【0021】

【化 9】



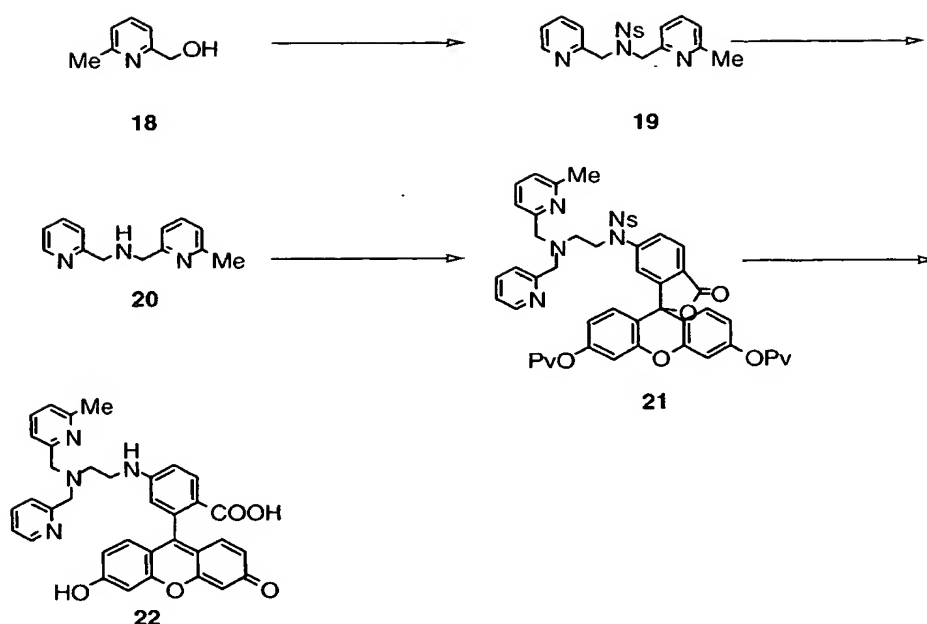
【 0 0 2 2 】

【化10】



【0023】

【化 11】



【0024】

原料化合物として用いることができる4-アミノフルオレセイン、5-アミノフルオレセイン、及び6-アミノフルオレセインなどの化合物は、例えば、亀谷哲治著、有機合成化学IX、南江堂、215頁(1977年)等に準じて製造できる。反応を行うにあたってアミノ基を保護基する場合には、保護基の種類は特に限定されないが、例えば、p-ニトロベンゼンスルホン酸基、トリフルオロアセチル基、トリアルキルシリル基などを適宜利用できる。アミノ基の保護基については、例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis)、グリーン (T. W. Greene) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons, Inc.) (1981年)などを参照することができる。

【0025】

上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、又は(IIB)で表される本発明の化合物又はその塩は、亜鉛蛍光プローブとして有用である。上記一般式(I)又は一般式(II)で表される本発明の化合物又はその塩は、それ自体は強い蛍光を発する性質を有していないが、亜鉛イオンを捕捉して亜鉛錯体を形成すると、強い蛍光を発するようになる。上記化合物又はその塩は亜鉛イオンを特異的に捕捉することができ、極め

て錯体形成が速やかであるという特徴を有している。また、形成された亜鉛錯体は、生体組織や細胞に障害を生じない長波長領域の励起光によって強い蛍光を発するという特徴がある。従って、上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、又は(IIB)で表される本発明の化合物又はその塩は、生細胞や生組織中の亜鉛イオンを生理条件下で測定するための亜鉛蛍光プローブとして極めて有用である。また、上記一般式(IA)、(IB)、(IIA)、又は(IIB)で表される本発明の化合物又はその塩は、高い亜鉛イオン濃度の領域において亜鉛イオン濃度依存的に亜鉛錯体を形成できるという特徴があり、高濃度の亜鉛イオンを含む試料の亜鉛イオン濃度を測定するために好適に用いることができる。なお、本明細書において用いられる「測定」という用語については、定量及び定性を含めて最も広義に解釈すべきものである。

【0026】

本発明の亜鉛蛍光プローブの使用方法は特に限定されず、従来公知の亜鉛プローブと同様に用いることが可能である。通常は、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体との混合物などに上記一般式(I)で表される化合物及びその塩からなる群から選ばれる一の物質を溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。本発明の亜鉛蛍光プローブを適切な添加物と組み合わせて組成物の形態で用いてもよい。例えば、緩衝剤、溶解補助剤、pH調節剤などの添加物と組み合わせることができる。

【0027】

本発明により提供される第二の態様の亜鉛イオンの測定方法は、上記の一般式(IIA)又は(IIIB)において、

- (1)s及びtが1であり、R²⁵及びR²⁶が水素原子である化合物又はその塩
- (2)s及びtが1であり、R²⁵が水素原子であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩
- (3)s及びtが1であり、R²⁵及びR²⁶がメチル基である化合物又はその塩
- (4)sが1であり、tが2であり、R²⁵及びR²⁶が水素原子である化合物又はその塩
- (5)sが1であり、tが2であり、R²⁵が水素原子であり、R²⁶がメチル基である化

合物又はその塩

(6)sが1であり、tが2であり、R²⁵がメチル基であり、R²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(7)sが1であり、tが2であり、R²⁵及びR²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(8)s及びtが2であり、R²⁵及びR²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(9)s及びtが2であり、R²⁵が水素原子であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(10)s及びtが2であり、R²⁵及びR²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(11)tが1であり、uが0であり、R²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(12)tが1であり、uが0であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

(13)tが2であり、uが0であり、R²⁶が水素原子である化合物又はその塩

(14)tが2であり、uが0であり、R²⁶がメチル基である化合物又はその塩

からなる群から選択される2個以上の化合物又はその塩を用いて亜鉛イオンを測定する工程を含む。

【0028】

一般式(IIIA)又は(IIIB)において、R²¹からR²⁷は一般式(IIA)又は(IIB)について説明したR¹¹からR¹⁷と同様である。R²¹及びR²²はともに水素原子であることが好ましく、イメージングの用途ではR²¹及びR²²がアセチル基又はアセトキシメチル基であることが好ましい。R²³及びR²⁴がともに水素原子であるか、ともに塩素原子であることが好ましく、R²³及びR²⁴がともに水素原子であることがさらに好ましい。R²⁷が水素原子であることが好ましい。上記の(1)から(14)の化合物又はその塩からなる群から選択される2個以上の化合物又はその塩は、それぞれ異なる亜鉛イオン濃度領域において亜鉛錯体を形成することができるので、これらの2個以上の化合物又はその塩を組み合わせる用いることによって広範囲の濃度で亜鉛イオンを正確に測定することができる。例えば、上記の(1)から(14)の化合物又はその塩からなる群から選択される3個以上の化合物又はその塩を用いることが好ましく、より好ましくは4個以上の化合物又はその塩を用いることができる。選択される2個以上の化合物のうち、少なくとも1個は上記の(1)又は(11)以外の化合物から選択される化合物であることが好ましい。

【0029】

この方法を行うにあたり、化合物又はその塩の選択は測定対象となる亜鉛イオンの濃度に応じて適宜行うことができるが、例えば、本明細書の実施例に具体的に示された方法に従って、図1のグラフを参照しつつ2個以上の化合物又はその塩を選択できる。図1のグラフに示された化合物8、化合物13、化合物17、及び化合物22は、それぞれ上記の(11)、(4)、(8)、及び(2)においてR²¹、R²²、R²³、R²⁴、及びR²⁷が水素原子の化合物であり、これらの4種類の化合物により10⁻⁸から10⁻³ mol/Lの亜鉛イオンを正確に測定できる。このように、化合物の選択は、各化合物について亜鉛イオンの濃度変化に対する蛍光強度変化を求め、蛍光強度変化比（ある亜鉛イオン濃度における蛍光強度／最大蛍光強度）が0.5となる亜鉛イオン濃度が2つの化合物間で10倍以上となるように選択するのがよい。

【0030】

また、この方法を行うにあたり、亜鉛イオン濃度の測定のために用いられる他の試薬を1又は2個以上組み合わせて用いてもよい。例えば、図1のグラフにおいて、上記の4種類の化合物に公知化合物であるZnAF-2（国際公開W0 01/62755の化合物12）を組み合わせることによって、10⁻⁹から10⁻³ mol/Lの亜鉛イオンを正確に測定できる。なお、上記の(1)から(14)の化合物又はその塩からなる群から選ばれる2個以上の化合物又はその塩を組み合わせた亜鉛イオン測定用のキットも本発明の範囲に包含されるが、このキットにおいて、亜鉛イオン濃度の測定のために用いられる他の試薬を1又は2個以上組み合わせて用いてもよい。

【0031】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中の化合物番号は、上記のスキーム中の化合物番号に対応している。

例1：化合物8の合成

5-アミノフルオレセイン（1）4.0 g（12 mmol）を80 mlのジメチルホルムアミドに溶かした溶液に、炭酸セシウム7.9 g（24 mmol）を加えた。続いて、この溶

液に無水ピバル酸4.9 ml (24 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を桐山漏斗で濾過し、ジメチルホルムアミドを減圧下留去した後、シリカゲルカラムで精製し、化合物 2 (5.9 g) を得た。白色固体。収率100%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

7.77 (d, 1H, $J=8.3$), 7.01 (d, 2H, $J=2.2$), 6.95 (d, 2H, $J=8.6$), 6.80-6.75 (m, 3H), 6.22 (d, 1H, $J=1.8$), 4.21 (s, 2H), 1.36 (s, 18H)

MASS (FAB) : 516 (M^++1)

【 0 0 3 2 】

化合物 2 (5.9 g, 12 mmol) を塩化メチレン100 mlに溶かし、ピリジン3.5 ml (46 mmol) を加えた。続いて4-ニトロベンゼンスルホニルクロリド7.7 g (35 mmol) を加えた後、室温で6時間攪拌した。塩化メチレンを300 ml加えた後、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去した後、シリカゲルカラムにより精製し、化合物 3 (5.5 g) を得た。白色固体。収率69%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.20 (d, 2H, $J = 9.0$), 7.88 (d, 1H, $J = 8.2$), 7.81 (d, 2H, $J = 9.0$), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.05 (d, 2H, $J = 2.0$), 6.83 (d, 1H, $J = 1.5$), 6.74 (dd, 2H, $J = 8.7, 2.1$), 6.68 (d, 2H, $J = 8.7$), 1.38 (s, 18H)

MASS (FAB) : 701 (M^++1)

【 0 0 3 3 】

化合物 3 (3.0 g, 4.3 mmol) を300 mlのアセトニトリルに溶かした溶液に、炭酸カリウム3.0 g (21 mmol) 、1,2-ジブロモエタン15 ml (0.17 mol) を加え、100度で20時間攪拌した。アセトニトリルを減圧下留去し、水500 mlに懸濁させた。この懸濁液を塩化メチレンで抽出した後、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去した後、シリカゲルカラムにより精製し、化合物 4 (2.9 g) を得た。白色固体。収率84%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.12-8.09 (m, 3H), 7.71 (dd, 1H, $J = 8.2, 1.8$), 7.56 (d, 2H, $J = 9.0$), 7.02 (d, 2H, $J = 2.2$), 6.86 (dd, 2H, $J = 8.6, 2.2$), 6.43 (d, 1H, $J = 1.8$)

, 3.85 (t, 2H, J = 6.6), 3.40 (t, 2H, J = 6.6), 1.38 (s, 18H)

MASS (FAB) : 807, 809 ($M^{+}+1$)

【 0 0 3 4 】

2-アミノメチルピリジン (5) 3 ml (29 mmol) とピリジン 6 ml (74 mmol) を 60 ml の塩化メチレンに溶かした溶液に、4-ニトロベンゼンスルホニルクロリド 7.2 g (33 mmol) を 40 ml の塩化メチレンに溶かした溶液を 30 分かけて滴下した。滴下後室温で 1 時間攪拌した後、反応溶液を 2 M 炭酸ナトリウム水溶液で洗った。飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去した後、シリカゲルカラムにより精製し、化合物 6 (5.4 g) を得た。白色固体。収率 64%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.44-8.42 (m, 1H), 8.27 (d, 2H, J=8.7), 8.03 (d, 2H, J=8.7), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.19-7.13 (m, 2H), 6.25 (s, 1H), 4.34 (s, 2H)

MASS (EI) : 293 (M^{+})

【 0 0 3 5 】

化合物 4 (0.30 g, 0.37 mmol) を 20 ml のアセトニトリルに溶かした溶液に化合物 6 (0.15 g, 0.51 mmol) と炭酸カリウム 70 mg (0.51 mmol) を加え、100 度で 2 時間攪拌した。アセトニトリルを減圧下留去した後、2 M 炭酸ナトリウム水溶液に溶かし、塩化メチレンで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去した後、シリカゲルカラムにより精製し、化合物 7 (0.12 g) を得た。黄色固体。収率 31%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.24 (d, 2H, J=8.8), 8.10 (d, 2H, J=8.8), 8.07 (d, 1H, J=8.4), 8.03-8.01 (m, 1H), 7.80 (d, 2H, J=8.8), 7.65-7.57 (m, 2H), 7.50 (d, 2H, J=8.8), 7.24 (d, 1H, J=7.7), 7.13-7.08 (m, 1H), 6.97 (d, 2H, J=1.5), 6.82-6.80 (m, 4H), 6.63 (d, 1H, J=1.5), 4.36 (s, 2H), 3.66 (t, 2H, J=7.1), 3.43 (t, 2H, J=7.1), 1.38 (s, 18H)

MASS (FAB) : 1020 ($M^{+}+1$)

【 0 0 3 6 】

化合物 7 (0.11 g, 0.11 mmol) を 10 ml のジメチルホルムアミドに溶かした溶液に、炭酸カリウム 80 mg (0.58 mmol)、チオフェノール 0.1 ml (1.0 mmol) を加え、室温で 5 時間攪拌した。水酸化カリウム 200 mg (3.4 mmol) を、1 ml の MeOH と 1 ml の水に溶かした溶液を加え、室温で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後、2 M 塩酸に溶かした。ジエチルエーテルで洗浄後、2 M 塩酸を減圧下留去した。残渣を ODS カラム及び逆相 HPLC で精製し、化合物 8 (44 mg) を 3TFA 塩として得た。褐色固体。収率 48%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300M Hz) :

8.39-8.37 (m, 1H), 7.74 (d, 1H, $J=8.6$), 7.74-7.68 (m, 1H), 7.29-7.24 (m, 2H), 6.86-6.79 (m, 3H), 6.74 (d, 2H, $J=2.2$), 6.60 (dd, 2H, $J=8.8, 2.2$), 6.28 (d, 1H, $J=2.0$), 4.25 (s, 2H), 3.45 (t, 2H, $J=6.2$), 3.14 (t, 2H, $J=6.2$)

MASS (FAB) : 482 (M^++1)

【0037】

例 2 : 化合物 13 の合成

化合物 6 (1 g, 3.4 mmol) を 80 ml のベンゼンに溶かした溶液に、2-ピリジンエタノール (9) 0.5 ml (4.4 mol)、アゾジカルボン酸エステル (40%トルエン溶液) 2.5 ml (5.2 mmol)、トリフェニルホスフィン 1.25 g (4.8 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。ベンゼンを減圧下留去した後、2 M 炭酸ナトリウム水溶液に溶かし、塩化メチレンで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去した後、シリカゲルカラムにより精製し、化合物 10 (0.95 g) を得た。黄色オイル。収率 70%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.43-8.40 (m, 2H, $J=8.6$), 8.26 (d, 2H, $J=8.6$), 7.68-7.62 (m, 1H), 7.57-7.51 (m, 1H), 7.38 (d, 1H, $J=7.9$), 7.20-7.16 (m, 1H), 7.11-7.09 (m, 1H), 7.06 (d, 1H, $J=7.7$), 4.58 (s, 2H), 3.74 (t, 2H, $J=7.3$), 3.00 (t, 2H, $J=7.3$)

MASS (FAB) : 399 (M^++1)

【0038】

化合物 1 0 (0.95 g, 2.4 mmol) を 50 ml のジメチルホルムアミドに溶かした溶液に、炭酸カリウム 0.99 g (7.2 mmol)、チオフェノール 0.49 ml (4.8 mmol) を加え、室温で 10 時間攪拌した。ジメチルホルムアミドを減圧下留去した後、2 M 炭酸ナトリウム水溶液に溶かし、塩化メチレンで抽出した。飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去した後、シリカゲルカラムにより精製し、化合物 1 1 (0.37 g) を得た。黄色オイル。収率 73%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.54–8.53 (m, 2H), 7.65–7.56 (m, 2H), 7.30 (d, 1H, $J=7.7$), 7.20–7.09 (m, 3H), 3.96 (s, 2H), 3.12–3.00 (m, 4H), 2.07 (br, 1H)

MASS (FAB) : 214 (M^++1)

【 0 0 3 9 】

化合物 4 (0.20 g, 0.25 mmol) をアセトニトリル 50 ml に懸濁させて、ヨウ化カリウム 0.10 g (0.60 mmol)、炭酸カリウム 0.10 g (0.72 mmol)、化合物 1 1 (0.20 g, 0.94 mmol) を加えて 1 4 時間還流した。アセトニトリルを減圧下留去した後、2 N 炭酸ナトリウム水溶液に溶かし、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去し、シリカゲルカラムにより精製して、化合物 1 2 (38 mg) を得た。黄色固体。収率 16%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.41–8.40 (m, 1H), 8.36–8.34 (m, 1H), 8.08 (d, 2H, $J=8.6$), 8.00 (d, 1H, $J=8.2$), 7.58–7.50 (m, 5H), 7.14–7.03 (m, 4H), 6.96 (d, 2H, $J=2.2$), 6.68 (d, 2H, $J=8.6$), 6.58 (d, 1H, $J=1.5$), 3.67 (s, 2H), 3.57 (t, 2H, $J=6.6$), 2.83–2.76 (m, 4H), 2.66 (t, 2H, $J=6.6$), 1.31 (s, 18H)

MASS (FAB) : 940 (M^++1)

【 0 0 4 0 】

化合物 1 2 (38 mg, 40 μmol) から化合物 8 の合成法と同様にして化合物 1 3 (18 mg) を 4TFA 塩として得た。褐色固体。収率 43%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.33–8.30 (m, 2H), 7.95–7.89 (m, 1H), 7.86–7.80 (m, 1H), 7.65 (d, 1H, $J=$

8.6), 7.43-7.32 (m, 4H), 6.77 (dd, 1H, J=8.6, 2.0), 6.68-6.65 (m, 4H), 6.53 (dd, 2H, J=8.8, 2.4), 6.16 (d, 1H, J=2.4), 4.41 (s, 2H), 3.45-3.41 (m, 4H), 3.24-3.12 (m, 4H)

MASS (FAB) : 587 ($M^{+}+1$)

【0041】

例3: 化合物17の合成

2-ビニルピリジン (14) 0.5 ml (4.6 mmol) を50 mlのメタノールに加えた溶液に2-アミノエチルピリジン0.56 ml (4.6 mmol)、氷酢酸0.27 ml (4.6 mmol) 加えてアルゴン下で24時間還流した。室温まで冷却後、氷水に注いで、2 M水酸化ナトリウム水溶液で中和した。塩化メチレンで抽出し、硫酸マグネシウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去し、シリカゲルカラムにより精製して化合物15 (0.27 g) を得た。黄色オイル。収率25%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.50 (d, 2H, J=4.0), 7.57 (td, 2H, J=7.7, 1.8), 7.16-7.08 (m, 4H), 3.08-3.03 (m, 4H), 2.99-2.94 (m, 4H), 1.96 (br, 1H)

MASS (EI) : 227 (M^{+})

【0042】

化合物4 (0.10 g, 0.12 mmol) および化合物15 (60 mg, 0.26 mmol) から化合物12の合成法と同様にして化合物16 (25 mg) を得た。黄色固体。収率21%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.36-8.34 (m, 2H), 8.09 (d, 2H, J=8.6), 8.01 (d, 1H, J=8.2), 7.55-7.50 (m, 4H), 7.09-7.05 (m, 2H), 7.01-6.98 (m, 2H), 6.94 (d, 2H, J=1.1), 6.76-6.75 (m, 4H), 6.64 (d, 1H, J=1.5), 3.45 (t, 2H, J=7.0), 2.80-2.76 (m, 4H), 2.69-2.64 (m, 4H), 2.60 (t, 2H, J=7.0)

MASS (FAB) : 954 ($M^{+}+1$)

【0043】

化合物16 (25 mg, 26 μmol) から化合物8の合成法と同様にして化合物17 (12 mg) を4TFA塩として得た。褐色固体。収率21%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.09–8.07 (m, 2H), 7.87–7.81 (m, 2H), 7.76 (d, 1H, $J=8.6$), 7.38 (d, 2H, $J=7.9$), 7.31–7.27 (m, 2H), 6.88 (dd, 1H, $J=8.6, 2.2$), 6.75 (d, 2H, $J=8.8$), 6.73 (d, 2H, $J=2.4$), 6.61 (dd, 2H, $J=8.8, 2.4$), 3.71–3.62 (m, 6H), 3.48 (t, 2H, $J=5.7$), 3.23 (t, 4H, $J=6.4$)

MASS (FAB) : 601 (M^++1)

【 0 0 4 4 】

例 4 : 化合物 2 2 の合成

化合物 6 (2.0 g, 6.8 mmol) および 6-メチル 2-ピリジンメタノール (18) 1.1 g (8.8 mmol) から化合物 10 の合成法と同様にして化合物 19 (2.4 g) を得た。黄色オイル。収率 88%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.39–8.38 (m, 1H), 8.23 (d, 2H, $J=8.8$), 7.98 (d, 2H, $J=8.8$), 7.67–7.61 (m, 1H), 7.51–7.45 (m, 1H), 7.39 (d, 1H, $J=7.7$), 7.17–7.13 (m, 1H), 7.09–7.07 (m, 1H), 6.98–6.95 (m, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 2.30 (s, 3H)

MASS (EI) : 398 (M^+)

【 0 0 4 5 】

化合物 19 (2.4 g, 6.0 mmol) から化合物 11 の合成法と同様にして化合物 20 (0.78 g) を得た。黄色オイル。収率 61%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.55 (m, 1H), 7.64 (td, 1H, $J=7.5, 1.9$), 7.53 (t, 1H, $J=7.7$), 7.37 (d, 1H, $J=7.5$), 7.15 (d, 1H, $J=7.7$), 7.15–7.14 (m, 1H), 7.01 (d, 1H, $J=7.7$), 3.99 (s, 2H), 3.94 (s, 2H), 2.54 (s, 3H)

MASS (FAB) : 214 (M^++1)

【 0 0 4 6 】

化合物 4 (0.45 g, 0.56 mmol) および化合物 20 (0.24 g, 1.1 mmol) から化合物 12 の合成法と同様にして化合物 21 (0.18 g) を得た。黄色固体。収率 35%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.43-8.41 (m, 1H), 8.06 (d, 2H, $J=8.8$), 7.96 (d, 1H, $J=8.6$), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.53-7.48 (m, 2H), 7.51 (d, 2H, $J=8.8$), 7.35-7.32 (m, 1H), 7.16-7.12 (m, 2H), 7.03-6.99 (m, 1H), 7.00 (d, 2H, $J=2.2$), 6.76 (dd, 2H, $J=8.6, 2.2$), 6.62 (d, 2H, $J=8.6$), 6.46 (d, 1H, $J=1.3$), 3.69-3.65 (m, 6H), 2.67 (t, 2H, $J=6.2$), 2.48 (s, 3H), 1.37 (s, 18H)

MASS (FAB) : 940 (M^++1)

【 0 0 4 7 】

化合物 2 1 (0.18 g, 0.19 mmol) から化合物 8 の合成法と同様にして化合物 2 2 (76 mg) を 4TFA 塩として得た。褐色固体。収率 38%。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) :

8.47-8.45 (m, 1H), 7.95-7.84 (m, 2H), 7.65 (d, 1H, $J=8.6$), 7.46-7.38 (m, 4H), 6.74 (dd, 1H, $J=8.6, 2.0$), 6.68 (d, 2H, $J=2.4$), 6.65 (d, 2H, $J=8.8$), 6.56 (dd, 2H, $J=8.8, 2.4$), 6.07 (d, 1H, $J=2.0$), 4.32 (s, 2H), 4.28 (s, 2H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.08 (t, 2H, $J=5.9$), 2.55 (s, 3H)

MASS (FAB) : 587 (M^++1)

【 0 0 4 8 】

例 5 : 化合物 2 7 の合成

6-メチル2-ピリジンメタノール (18) 4.0 g (33 mmol) を 150 ml の塩化メチレンに溶かした溶液に塩化チオニル 12 ml (0.17 mol) を滴下した。滴下後 45 度で 1 時間還流した。塩化メチレンを減圧下留去した後、2 M 炭酸ナトリウム水溶液に溶かし、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸カリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去し化合物 2 3 (4.5 g) を得た。無色オイル。収率 97%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

7.60 (t, 1H, $J=7.7$), 7.28 (d, 1H, $J=7.7$), 7.09 (d, 1H, $J=7.7$), 4.64 (s, 2H), 2.56 (s, 3H)

MASS (EI) : 141 (M^+)

【 0 0 4 9 】

化合物 2 3 (2.0 g, 14 mmol) を 200 ml のアセトニトリルに溶かした溶液に p-トルエンスルホンアミド 1.2 g (7.1 mmol) を加えて 90 度で 18 時間還流した。アセトニトリルを減圧下留去し、水 200 ml に懸濁させた。この懸濁液を塩化メチレンで抽出した後、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去して化合物 2 4 (2.8 g) を得た。黄色固体。収率 100%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

7.70 (d, 2H, $J=8.2$), 7.42 (t, 2H, $J=7.7$), 7.23 (d, 2H, $J=8.2$), 7.13 (d, 2H, $J=7.7$), 6.91 (d, 2H, $J=7.7$), 4.55 (s, 4H), 2.41 (s, 3H), 2.36 (s, 6H)

MASS (FAB) : 382 ($\text{M}^+ + 1$)

【 0 0 5 0 】

化合物 2 4 (2.8 g, 7.3 mmol) を 50 ml の硫酸に溶かした後、120 度で 2 時間攪拌した。冷却後、氷水に注ぎ、2 M 水酸化ナトリウム水溶液で中和した。塩化メチレンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥した。塩化メチレンを減圧下留去し、シリカゲルカラムにより精製して化合物 2 5 (0.64 g) を得た。黄色固体。収率 39%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

7.53 (t, 2H, $J=7.5$), 7.17 (d, 2H, $J=7.5$), 7.02 (d, 2H, $J=7.5$), 3.97 (s, 4H), 2.54 (s, 6H)

MASS (EI) : 227 (M^+)

【 0 0 5 1 】

化合物 4 (0.10 g, 0.12 mmol) および化合物 2 5 (0.13 g, 0.57 mmol) から化合物 1 2 の合成法と同様にして化合物 2 6 (65mg) を得た。黄色固体。収率 55%。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) :

8.06 (d, 2H, $J=9.0$), 7.96 (d, 2H, $J=8.3$), 7.54-7.47 (m, 5H), 7.14 (d, 2H, $J=7.7$), 7.02-7.00 (d, 2H, $J=2.2$), 7.00 (d, 2H, $J=2.2$), 6.75 (dd, 2H, $J=8.6, 2.2$), 6.61 (d, 2H, $J=8.6$), 6.46 (d, 1H), 3.68-3.65 (m, 6H), 2.68 (t, 2H, $J=6.2$), 2.47 (s, 6H), 1.37 (s, 18H)

MASS (FAB) : 954 ($M^{+}+1$)

【 0 0 5 2 】

化合物 2 6 (65 mg, 0.068 mmol) から化合物 8 の合成法と同様にして化合物 2 7 (31 mg) を 4TFA 塩として得た。褐色固体。収率 43%。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) :

7.98-7.93 (m, 2H), 7.61 (d, 1H, $J=8.8$), 7.57 (d, 2H, $J=7.9$), 7.44 (d, 2H, $J=7.7$), 6.69 (dd, 1H, $J=8.8, 1.8$), 6.66-6.63 (m, 4H), 6.53 (dd, 2H, $J=8.8, 2.2$), 5.98 (d, 1H, $J=1.8$), 4.13 (s, 4H), 3.16-3.13 (m, 2H), 2.87-2.83 (m, 2H), 2.52 (s, 6H)

MASS (FAB) : 601 ($M^{+}+1$)

【 0 0 5 3 】

例 6

上記例 1 から 4 で得た化合物 8, 化合物 1 3、化合物 1 7、及び化合物 2 2 を用いて、亜鉛イオンによる蛍光強度変化を調べた。各化合物 1 μM の蛍光強度を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で測定した。結果を図 1 に示す。縦軸の蛍光強度は亜鉛を加えたときの最大の蛍光強度変化量を 1 としたときの蛍光強度変化を数値で表したものである。これらの化合物はいずれも ZnAF-2 (国際公開 WO 01/62755 の化合物 12) より低濃度領域で蛍光強度が変化することが示された。さらにこれら 5 種類の化合物を組み合わせることにより、 10^{-10} M から 10^{-3} M にわたる極めて広範囲な濃度領域で亜鉛イオンの濃度変化を捉えられることが示された。

【 0 0 5 4 】

例 7

化合物 8, 化合物 1 3、化合物 1 7、及び化合物 2 2 を用いて、亜鉛イオンに対する選択性を評価した。種々の金属イオン (1 μM 又は 5 mM) を含む 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中に 1 μM の化合物を加え、化合物 8、化合物 1 7、及び化合物 2 2 については励起波長 492 nm、蛍光波長 514 nm とし、化合物 1 3 については励起波長 492 nm、蛍光波長 521 nm として蛍光強度を測定した。結果を図 2 に示す。図中、縦軸の蛍光強度は、金属イオンを加えていないときの蛍光強度を 1 とし、各金属イオンを加えたときの蛍光強度を数値で示したものである。化合物 8

、化合物 13、化合物 17、及び化合物 22 が亜鉛イオンに対して極めて高い選択性を有しており、生体内に存在するナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンが高濃度 (5 mM) に存在する条件下でも全く蛍光強度が増加しないことが明らかである。またこれらの金属イオンが亜鉛イオンによる蛍光強度の増大に影響を与えないことも明らかである。

【0055】

例 8

pH の変化に対する化合物 8、化合物 13、化合物 17、及び化合物 22 とそれらの亜鉛錯体の蛍光強度の変化を調べた。化合物 8、化合物 17、及び化合物 22 については励起波長 492 nm、蛍光波長 514 nm とし、化合物 13 については励起波長 492 nm、蛍光波長 521 nm として蛍光強度を測定した。結果を図 3 に示す。緩衝液は以下のものを用いた。

100 mM Cl_2CHCOOH - $\text{Cl}_2\text{CHCOONa}$ 緩衝液 (pH 2.0-2.5)

100 mM ClCH_2COOH - $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 緩衝液 (pH 3.0-3.5)

100 mM AcOH - AcONa 緩衝液 (pH 4.0-5.0)

100 mM MES 緩衝液 (pH 5.5-6.5)

100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0-8.0)

100 mM CHES 緩衝液 (pH 8.0-9.0)

いずれの化合物も細胞内の pH である 7.4 付近では蛍光強度が安定であることがわかる。

【0056】

例 9

化合物 8、化合物 13、化合物 17、及び化合物 22 と亜鉛の錯形成速度定数を調べた。25℃ の 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で化合物の最終濃度が $1\mu\text{M}$ 、亜鉛イオンが $50\mu\text{M}$ となるように混合した後の蛍光強度の時間変化をストップドフローで測定した。このグラフより錯形成速度定数を算出すると化合物 8 では $1.6 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、化合物 13 では $1.4 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、化合物 17 では $7.8 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、化合物 22 では $1.3 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。いずれの化合物も蛍光が瞬時に増大した。従って、これらの化合物を用いると亜鉛を極めて短時間に検出することが

でき、亜鉛の速い濃度変化を検出することも可能であることがわかる。

【0057】

【発明の効果】

本発明の化合物又はその塩は亜鉛イオンの測定のために有用である。本発明の化合物又はその塩は、高濃度の亜鉛イオンが存在する試料中の亜鉛イオン濃度を正確に測定することができ、それらの化合物を適宜組み合わせることにより、極めて広範囲の亜鉛イオン濃度を正確に測定することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 亜鉛イオンの濃度変化に対する各被験化合物の蛍光強度変化を示した図である。

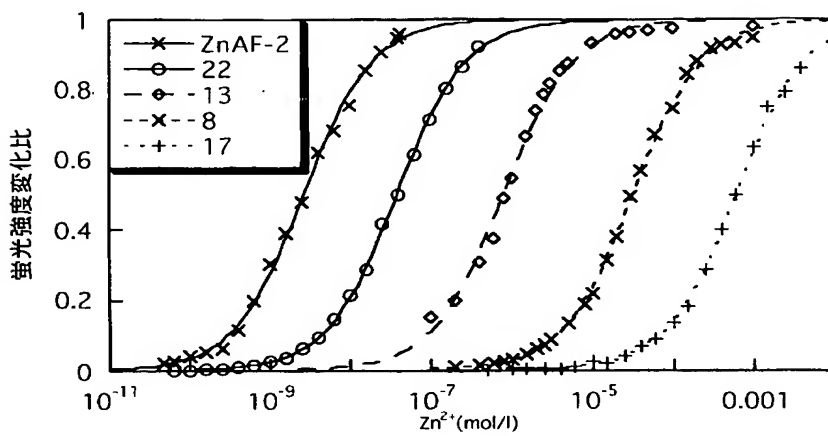
【図2】 各種金属イオンの存在下における各被験化合物の蛍光強度変化を示した図である。

【図3】 pHの変化に対する各被験化合物の蛍光強度変化を示した図である。

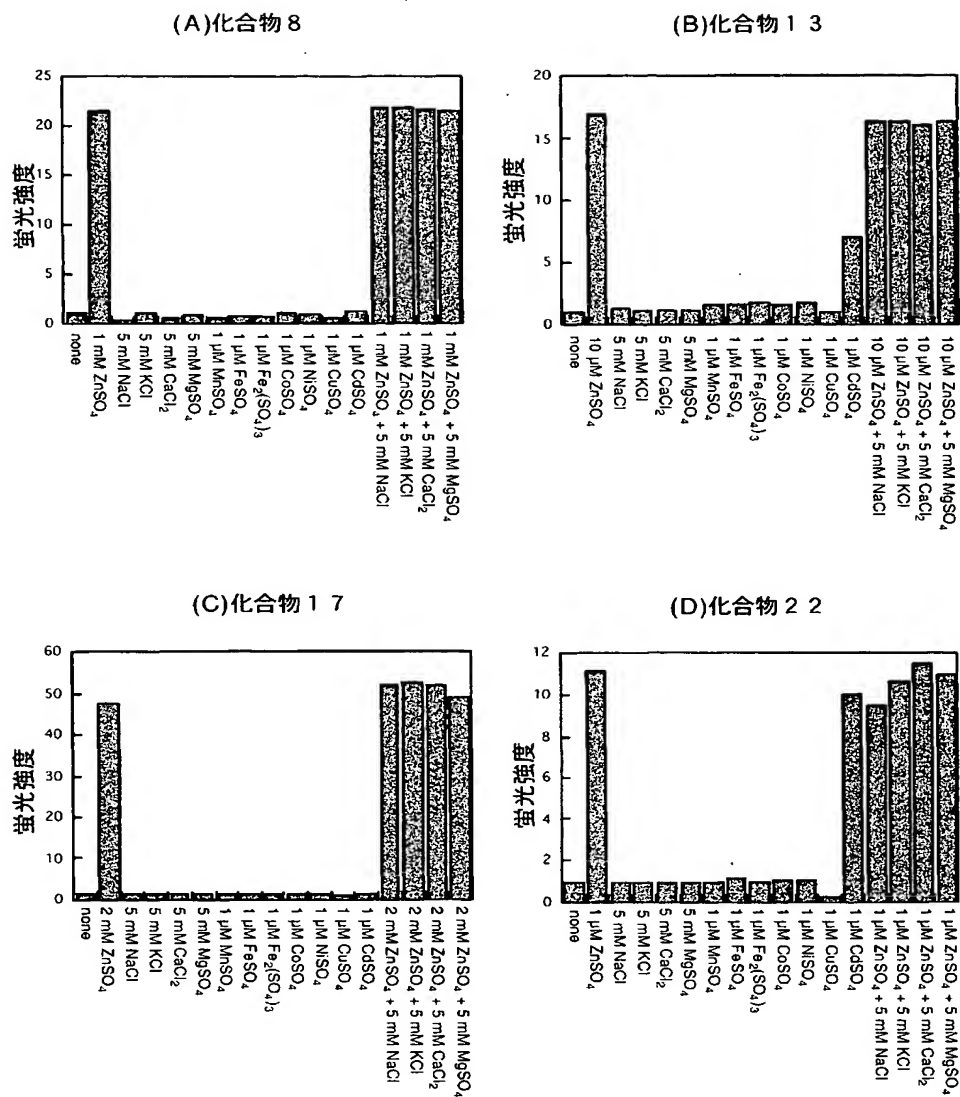
【図4】 各被験化合物と亜鉛イオンとの間での亜鉛錯体形成速度を示した図である。

【書類名】 図面

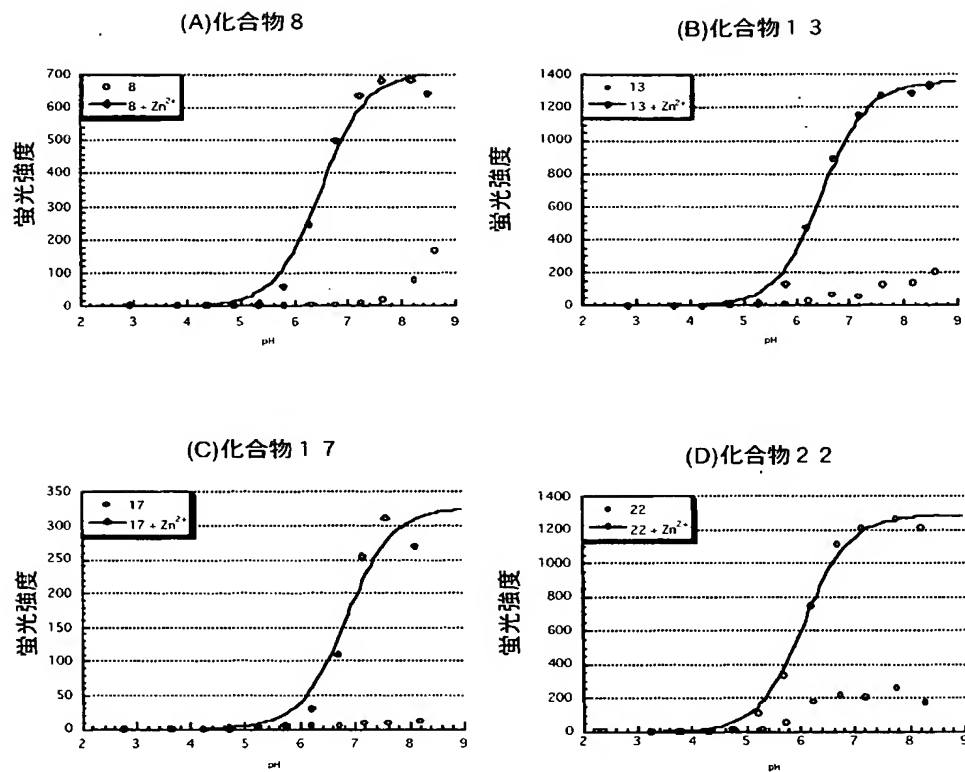
【図 1】



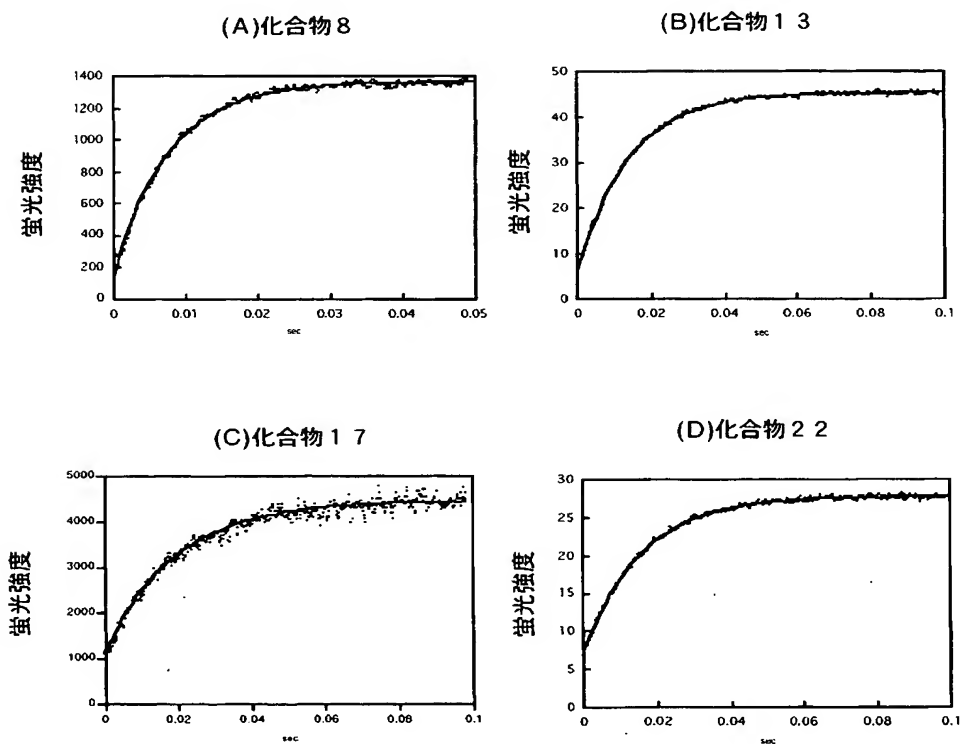
【図 2】



【図3】



【図4】



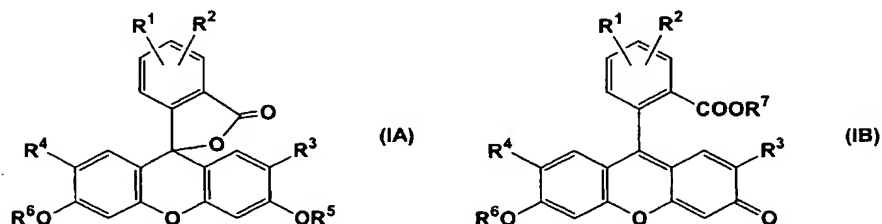
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 亜鉛イオンを特異的に捕捉して蛍光を発する亜鉛蛍光プローブを提供する。

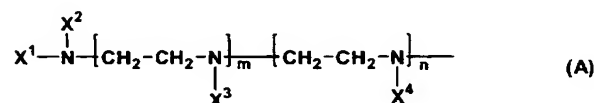
【解決手段】 下記の一般式 (IA) 又は (IB) :

【化 1】



[R¹及びR²は水素原子又は下記の式 (A) :

【化 2】



(X¹~X⁴は水素原子、2-ピリジルメチル基、2-ピリジリエチル基、2-メチル-6-ピリジルメチル基、又は2-メチル-6-ピリジリエチル基を示すが、少なくとも1つは2-ピリジルメチル基以外の基であり；m及びnは0又は1を示すが、同時に0となることはない) で表される基を示すが、R¹及びR²が同時に水素原子であることはなく；R³及びR⁴は水素原子又はハロゲン原子を示し；R⁵及びR⁶は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し、R⁷は水素原子又はアルキル基を示す] で表される化合物又はその塩。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 8 9 9 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 5 1 0 8 0 4 4]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 5 月 1 4 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都杉並区天沼 1 - 2 8 - 1 5
氏 名	長野 哲雄

特願 2 0 0 3 - 0 8 9 9 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 0 0 3 7 3 2 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 1 2 月 1 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋 3 丁目 1 3 番 5 号

氏 名

第一化学薬品株式会社